

PCT

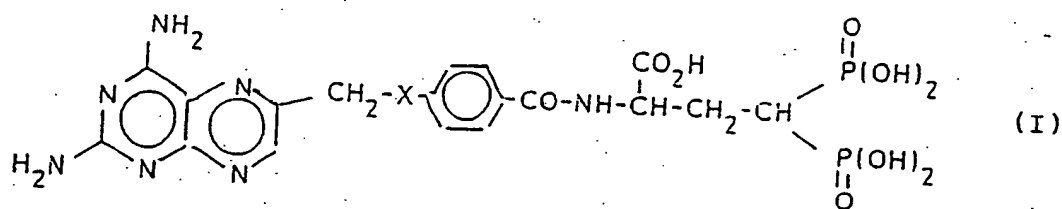
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁴ : C07F 9/65, A61K 31/675 C07F 9/38, 9/40	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 88/ 06158 (43) Date de publication internationale: 25 août 1988 (25.08.88)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00088 (22) Date de dépôt international: 18 février 1988 (18.02.88) (31) Numéro de la demande prioritaire: 87/02449 (32) Date de priorité: 20 février 1987 (20.02.87) (33) Pays de priorité: FR (71)(72) Déposant et inventeur: STURTZ, Georges [FR/FR]; 22, boulevard Léon-Blum, F-29200 Brest (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): VOISIN, Patricia [FR/FR]; 10, rue de Bohars, F-29200 Brest (FR). (74) Représentant commun: STURTZ, Georges; 22, boulevard Léon-Blum, F-29200 Brest (FR).	(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: GEM-DIPHOSPHONIC ANALOGUES OF AMETHOPTERIN AND OF DEAZA-N-10 AMETHOPTERIN

(54) Titre: ANALOGUES GEM-DIPHOSPHONIQUES D'AMETHOPTERINE ET DE DEAZA-N-10 AMETHOPTERINE



(57) Abstract

New derivatives of general formula (1) in which: either X = (a), where R¹ = H, lower alkyls (C₁ to C₆) or X = (b), where R¹ = H, lower alkyls (C₁ to C₆), as well as their metallic salts and their addition salts with nitrogen-containing bases. These products are useful as anticancer agents, in particular in the treatment of bone tumours, and therapeutic agents in the treatment of certain rheumatic disorders.

(57) Abrégé

Nouveaux dérivés de formule générale (1) dans laquelle: soit X = (a) avec R¹ = H, alkyles inférieurs (C₁ à C₆); soit X = (b) avec R¹ = H, alkyles inférieurs (C₁ à C₆), ainsi que leurs sels métalliques et leurs sels d'addition avec les bases azotées. Ces produits sont utiles comme agents anticancéreux, notamment dans le traitement des tumeurs osseuses, et comme agents thérapeutiques dans le traitement de certaines affections rhumatologiques.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

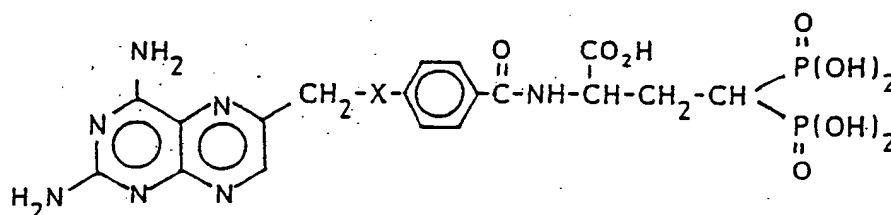
AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

- 1 -

Analogues gem-diphosphoniques d'améthoptérine et de déaza-N-10 améthoptérine.

La présente invention a pour objet la synthèse d'analogues gem-diphosphoniques d'améthoptérine (Methotrexate) et de déaza N-10 améthoptérine et leurs applications pharmacologiques.

Les composés diphosphoniques **1a** et **1b** de l'invention répondent à la formule générale :



1a : X = $\begin{smallmatrix} R^1 \\ | \\ -N- \end{smallmatrix}$ avec $R^1 = H$, alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

1b : X = $\begin{smallmatrix} R^1 \\ | \\ -CH- \end{smallmatrix}$ avec $R^1 = H$, alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

sous formes acides et sels pharmaceutiquement acceptables.

Le méthotrexate est un agent thérapeutique important. A faibles doses, en administration fractionnée, il est désormais couramment utilisé dans le traitement de rhumatismes psoriasiques rebelles, des polymyosites, de la maladie de Reiter et plus récemment des polyarthrites rhumatoïdes. On a montré qu'il possède à la fois des propriétés immuno-dépressives et anti-inflammatoires bien que son mécanisme d'action dans ces affections ne soit pas connu de façon précise.

A fortes doses, son utilisation comme agent antinéoplasique est courante, notamment en ce qui concerne le traitement d'un certain nombre de tumeurs cancéreuses parmi lesquelles des tumeurs osseuses.

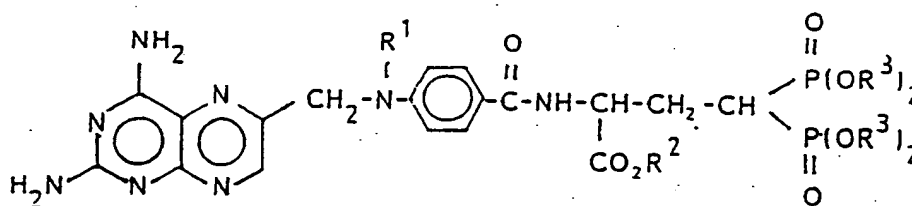
Cependant, l'intérêt comme agent anticancéreux du méthotrexate est sous la dépendance limitante des importants effets secondaires que son action entraîne sur l'ensemble de l'organisme.

La présente invention propose des analogues diphosphoniques du méthotrexate qui présentent en plus des propriétés déjà citées, un tropisme osseux très favorable au ratio thérapeutique activité/toxicité qui confère à ces composés un grand intérêt notamment pour les carcinomes osseux.

Ces composés ont fait l'objet dans leur phase finale d'une approche synthétique différente et seront donc présentés séparément. Ils seront obtenus, in fine, sous forme de sels de sodium.

En ce qui concerne les composés 1a, leur obtention résulte de l'action sur les formes 2a :

- premièrement de la soude,
- deuxièmement de l'action du bromure de triméthyl silyle suivie d'une méthanolyse.



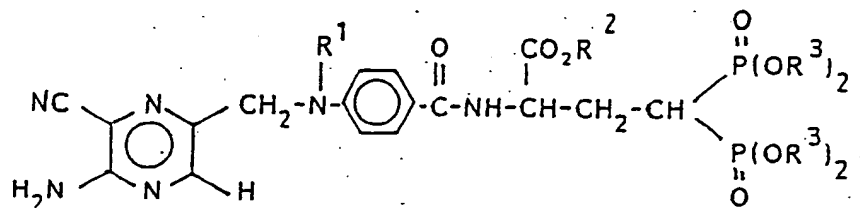
2a

R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

R^2 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

R^1 = H, alkyles inférieurs (D_1 à C_6).

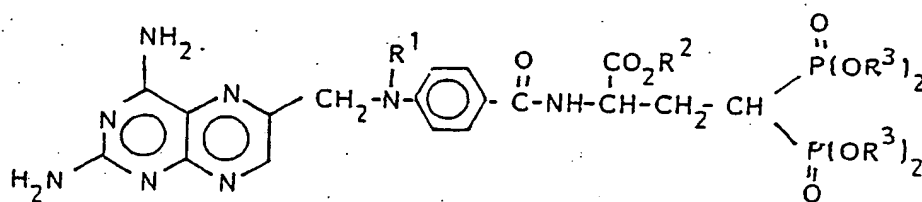
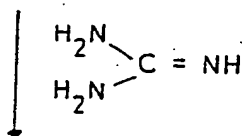
Dans la présente invention, le noyau ptéridine des composés 2a est obtenu par condensation de la guanidine sur des pyrazines diphosphoniques intermédiaires 3a synthétisées suivant l'approche que Taylor et Kobayashi décrivent dans le journal of Organic Chemistry, 38, 2817 (1973).

3a

R^2 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

R^1 = H, alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

2a

R^1 = H, alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

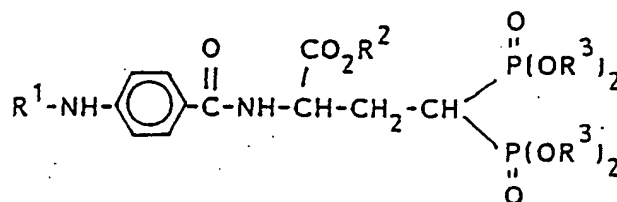
R^2 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

L'étape précédente qui suivant l'invention permet d'obtenir les composés 3a, est une condensation à température ambiante en présence de carbonate de potassium en excès

- 4 -

entre l' amino-2 bromométhyl-5 cyano-3 pyrazine dont la synthèse a été décrite par Taylor, Perlman, Sword, Sequin-Frey et Jacobson dans Journal of American Chemical Society, 95, 6407; (1973) et un dérivé N-((alkyl amino)-4 benzoyl) diphosphonoglutamique 4a de formule générale :

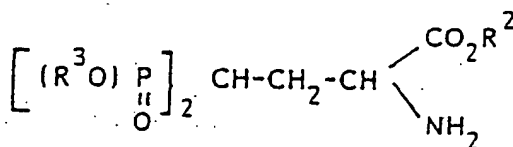
4a

$\text{R}^1 = \text{H}$, alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

$\text{R}^2 =$ alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

$\text{R}^3 =$ alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

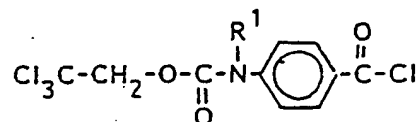
Ces dérivés 4a sont issus de la réaction suivant Schotten-Baumann d'un acide p-N(alkylamino) benzoïque sur les dérivés diphosphoniques, synthons communs aux composés 1a et 1b de l'invention : les amino-2 bis dialkyl phosphono-4,4 butyrates d'alkyle 5.

5

$\text{R}^2 =$ alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

$\text{R}^3 =$ alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

Le procédé de l'invention pour la préparation de composés de type 4a propose dans une première étape de protéger l'acide p-N(alkylamino) benzoïque par le trichloro-1,1,1 éthoxycarbonyl puis d'activer sa fonction acide par le chlorure de thionyle pour former intermédiairement les composés :

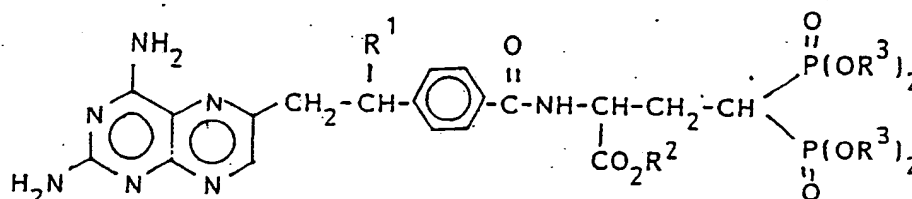


$\text{R}^1 = \text{H}$, alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

La deuxième étape permet, par condensation de composés de type 5 dilués dans un mélange 50-50 d'une solution saturée de bicarbonate de sodium et d'acétate d'éthyle, sur le chlorure d'acide N-protégé, d'obtenir après libération de la fonction amine par la poudre de zinc les dérivés de type 4a.

Les dérivés 1b, comme les composés 1a, dérivent de leurs analogues esters diphosphoniques 2b.

Après une hydrolyse des esters phosphoniques par le bromure de triméthyl silyle suivie d'une méthanolyse et une hydrolyse de l'ester carboxylique par action de la soude :



2b

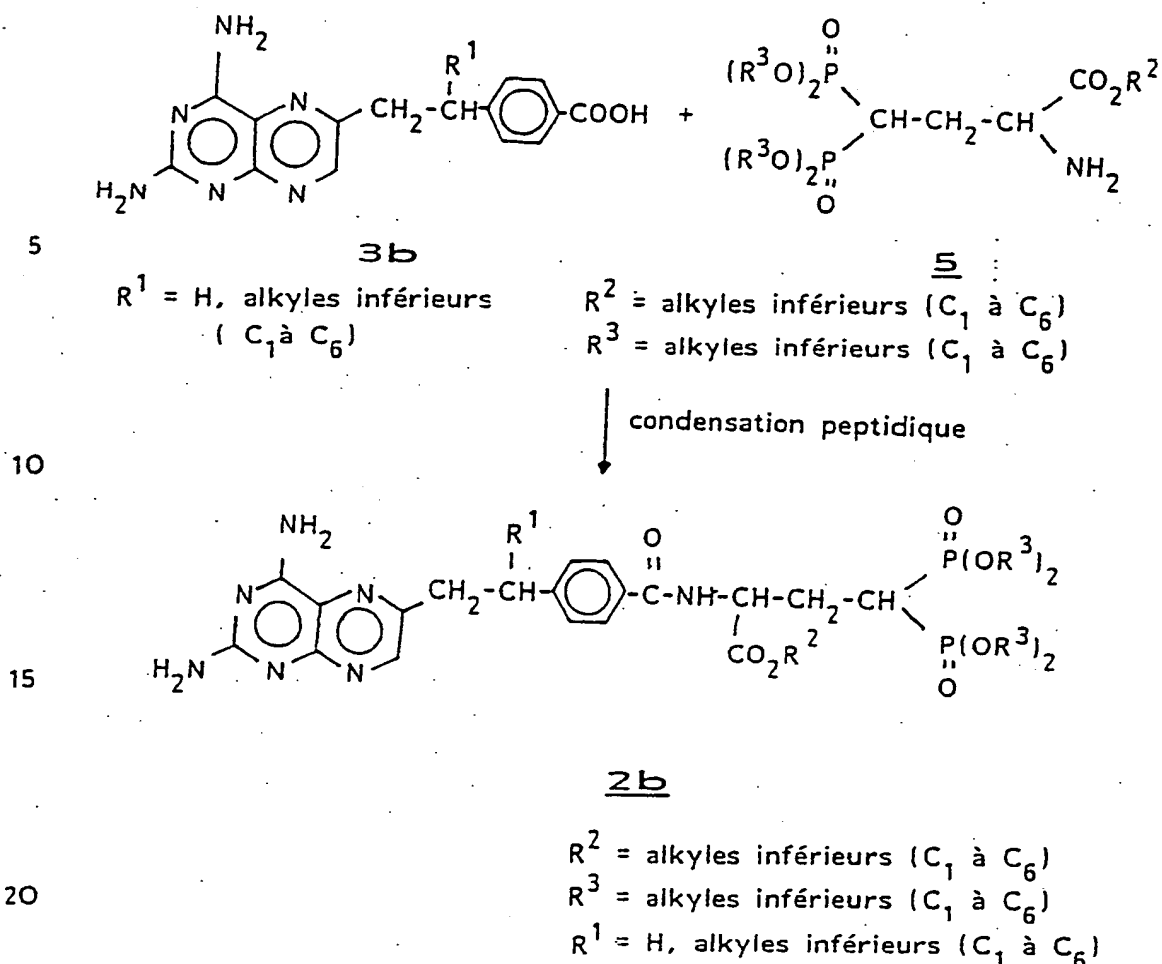
$R^1 = \text{H, alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$

$R^2 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$

$R^3 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$

En ce qui concerne les composés 2b ci-dessus, l'invention propose de les obtenir par une stratégie de synthèse totalement différente de celle utilisée pour les dérivés aza N-10 diphosphoniques de type a.

Le procédé de l'invention pour la préparation de composés déaza-10 aminoptérine repose en effet sur la condensation peptidique entre l'acide amino-4 désoxy-4 déaza-10 ptéroïque ou de ses dérivés alkylés en 10, dont les modes d'accès ont été décrits il y a plusieurs années, et les synthons diphosphoniques de formule générale 5.



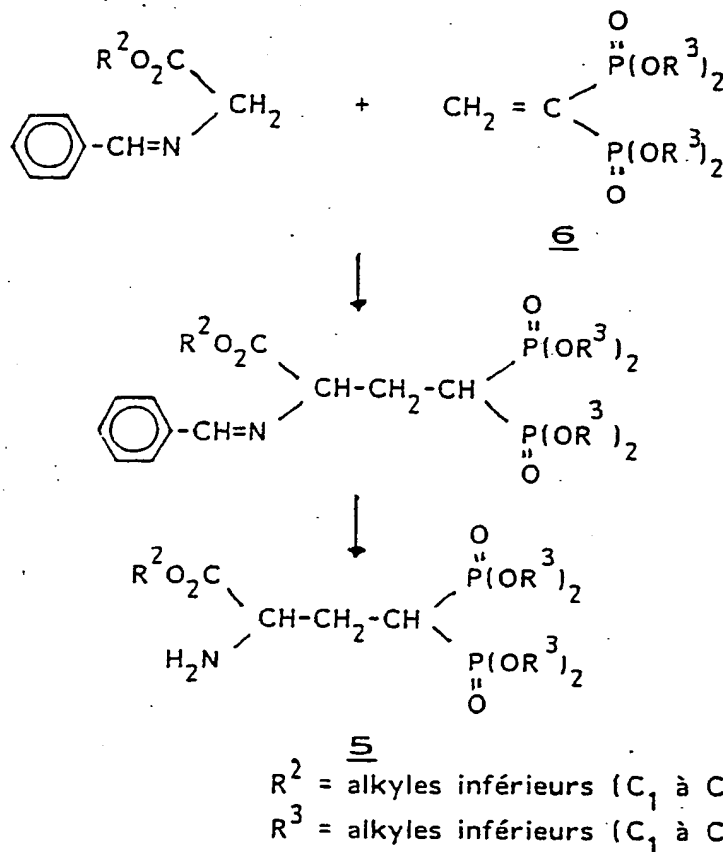
La littérature propose l'utilisation de différents agents de couplage pour réaliser ce type de condensation peptidique.

La méthode classique dite à "l'anhydride mixte" fait intervenir par exemple le chlorocarbonate d'isobutyle comme agent de couplage. La réaction a lieu, à température ambiante, en présence de triéthylamine dans le diméthylformamide.

L'invention utilise cette méthode de couplage et l'applique, avec le chlorocarbonate d'isobutyle, à la synthèse des dérivés analogues diphosphoniques déaza N-10 ou déaza N-10 alkyles N-10 du méthotrexate. Il est également possible d'utiliser toute méthode connue de l'homme de métier.

Sturtz et Guillaumot ont décrit dans "European Journal of medicinal chemistry", 19, 217, (1984) la synthèse d'analogues phosphoniques de l'acide glutamique et leur application à la synthèse par exemple d'analogues phosphoniques du méthotrexate.

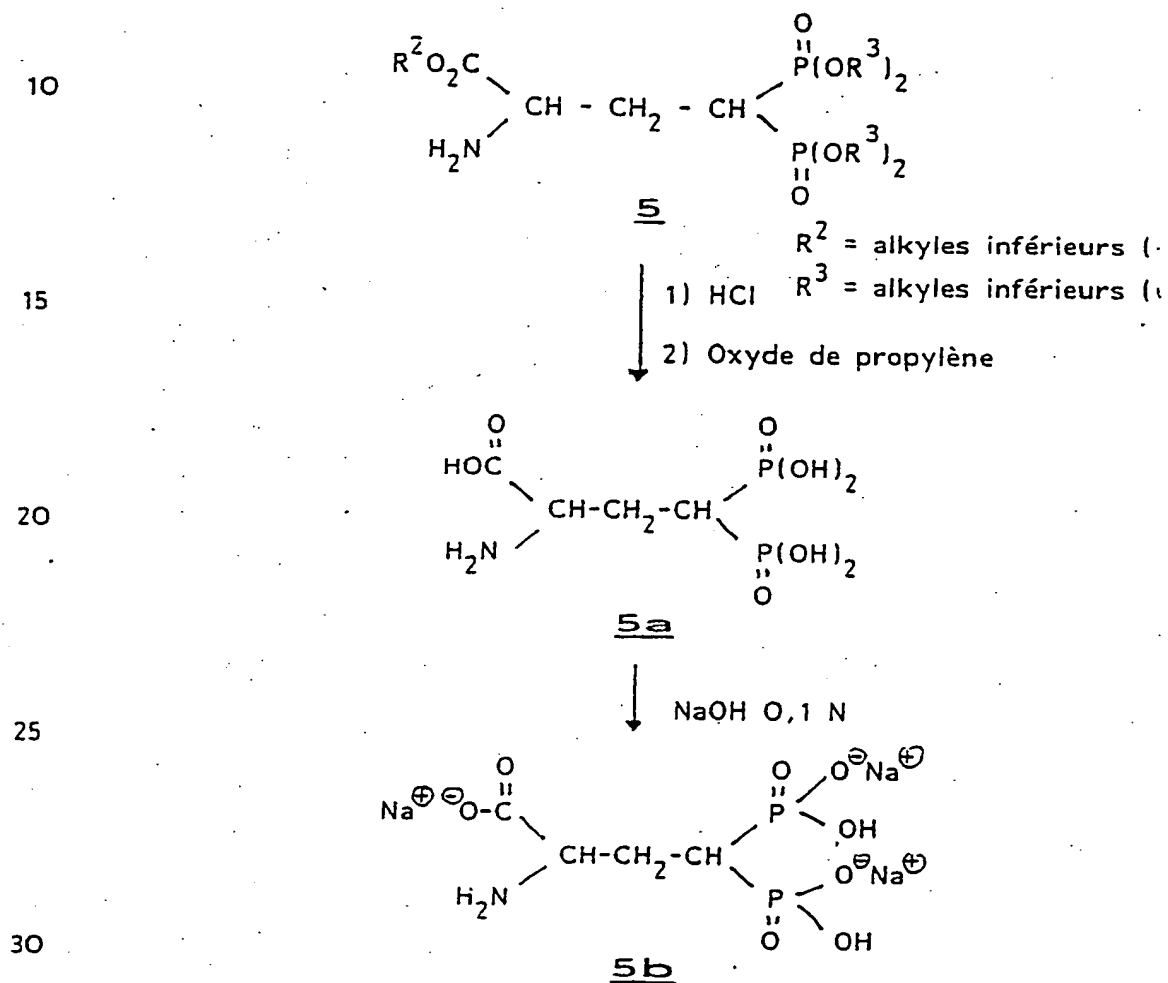
La présente invention propose la synthèse d'amino-2 bis dialkylphosphono-4,4 butyrates d'alkyle 5 par addition nucléophile de carbanion du N-benzylidène glycinate d'alkyle initialement décrit par Stork, Leong et Touzin dans Journal of Organic Chemistry, 41, 3491, (1976), sur les vinylidène diphosphonates de dialkyle-1,1 de formule générale 6 suivie d'une déprotection de la fonction amine en milieu HCl 0,5 N.



Outre leur intérêt dans la synthèse d'analogues phosphoniques du méthotrexate les composés de types 5 peuvent présenter des propriétés intrinsèques intéressantes.

Les formes acide 5a et sel de sodium 5b des composés 5 font également l'objet de la présente invention ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

Le composé 5a est obtenu par hydrolyse à l'acide chlorhydrique suivie d'une libération du chlorhydrate intermédiaire à l'oxyde de propylène. Le passage au sel de sodium 5b se fait par action de la soude 0,1 N.



Dans l'invention, les vinylidène diphosphonates de dialkyle 6 sont issus d'une isomérisation d'Arbuzov entre un trialkyl phosphite et un bromo-1 vinylphosphonate de dialkyle lui-même obtenu à partir d'un vinylphosphonate de dialkyle suivant le mode opératoire utilisé par Belbeoc'h, Thèse Doctorat Sciences Physiques, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Un certain nombre de tests biologiques ont été réalisés sur ces molécules par comparaison au Méthotrexate.

Ceux-ci montrent que :

- si l'activité inhibitrice sur la dihydrofolate réductase est environ 50 fois moins importante,

- si la cytotoxicité est environ 2000 fois moins importante pour les cellules L1210 en culture,

ces composés sont aussi actifs (à 30 mg/kg, voie orale) que le méthotrexate (à 15 mg/kg voie orale ou 50 mg/kg, voie intrapéritonéale) en traitement unique dans le modèle d'ostéosarcome murin.

Ils démontrent d'une manière incontestable la validité du concept de tropisme osseux et donc l'intérêt de ces produits pour les maladies osseuses.

Les exemples suivants illustrent l'application de ces synthèses à la préparation de dérivés analogues diphosphoniques du méthotrexate.

- 10 -

EXEMPLE 1

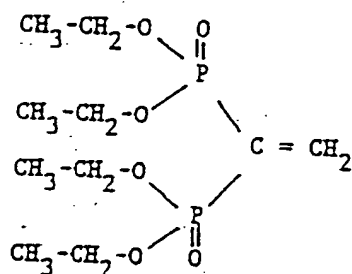
SYNTHESE DU COMPOSE **1a** ou $R^1 = CH_3$ a) Obtention du vinylidène diphosphonate de diéthyle ($R^3 = C_2H_5$)

5 Dans un tricol de 250 ml, muni d'une agitation magnétique et surmonté d'une ampoule isobare, d'un thermomètre à mercure et d'un appareillage de distillation, on place un mélange de 0,30 mole de chlorure de Nickel dans 0,39 mole de triéthylphosphite. Le mélange est
 10 porté à 120°C à l'aide d'un bain d'huile. On additionne alors goutte à goutte 0,39 mole de bromo-1 vinylphosphonate de diéthyle plus une petite quantité d'hydroquinone. Il y a décoloration puis recoloration de la solution en même temps que le bromure d'éthyle distille. Le chauffage est maintenu pendant une heure après la fin de l'addition.

15

Après traitement, le produit est distillé au vide de la pompe.

20

Eb_{0,05} = 130°C

Rdt = 45 %

25

a b c

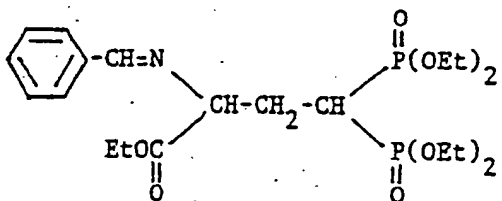
30 Spectre RMN : (CDCl₃)Phosphore : $\delta P = 13$ ppm

Proton δ : Ha = 1,33 ppm, t ; Hb = 4,25 ppm, m ;
 Hc = 6,98 ppm, qd. (JPHcis : 32,6 Hz ;
 JPHtrans : 36,5 Hz).

b.) Accès à l' amino-2 bis diéthylphosphono-4,4 butyrate d'éthyleb.1. Synthèse du produit N-protégé

Dans un tricol de 250 ml muni d'une agitation magnétique, on forme, sous atmosphère d'azote, une solution d'éthylate de sodium par addition de 9.10^{-3} mole de sodium dans 100 ml d'éthanol.

En contrôlant la température ($T < 5^{\circ}\text{C}$) on additionne goutte à goutte 0,1 mole de glycinate d'éthyle N-protégé pour en former le carbanion. Quand la température est aux environs de 0°C on ajoute 9.10^{-2} mole de bis(diéthylphosphono-1,1) vinylidène en maintenant la température inférieure à 5°C . L'agitation est maintenue deux jours à température ambiante. Un suivi de la réaction est réalisé par chromatographie sur couche mince. Le mélange est mené à un pH = 6-7 par addition d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. Après évaporation du solvant puis extraction à l'éther, séchage, filtration et à nouveau évaporation, on obtient quantitativement le produit N-protégé.



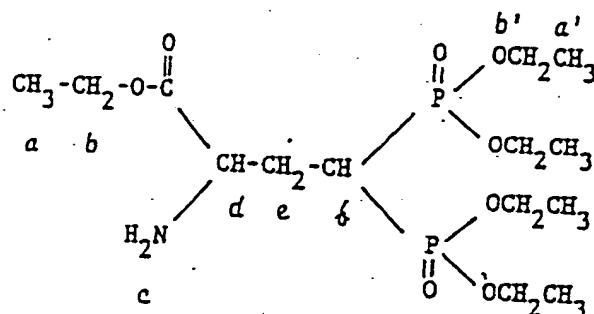
Spectre RMN : (CDCl_3)

Phosphore : $\delta\text{P} = 21,97$ ppm. Un pic dédoublé JP-P=9,76 Hz.

b.2. Déprotection de la fonction amine

Le produit N-protégé récupéré à l'étape précédente est repris dans 250 ml d'une solution HCl 0,5 N et mis sous agitation entre 0 et 10°C pendant deux heures. On extrait deux fois à l'éther afin d'éliminer le benzaldéhyde. A la phase aqueuse récupérée on additionne environ 300 ml d'une solution NaOH 0,5 N. Le pH passe ainsi de 1 à 11,5. Après extraction au chloroforme, on récupère la phase organique qui est séchée, filtrée puis évaporée. On récupère ainsi quantitativement un produit jaune huileux.

- 12 -

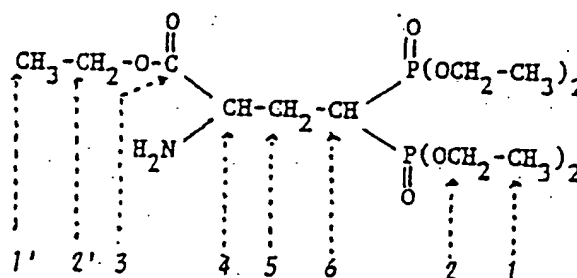


Rdt = 86 %

10 Spectre RMN (CDCl₃)Phosphore : $\delta P = 23,52 \text{ ppm}$; JP-P = 9,75 Hz doublet.

Proton δ : Ha+a' = 1,35 ppm, t ; Hc = 1,9 ppm, massif ;
 He : entre 2,3 et 3,5 ppm, massif ; Hf : entre 3,7 et 3,9 ppm, massif ; Hb+b' : entre 4 et 4,5 ppm, qd + t imbriqués ; Hd = 7,3 ppm massif.

Carbone



$\delta C1 = 16,10 \text{ ppm}$; $C1' = 15,7 \text{ ppm}$; $C6 = 32,7 \text{ ppm}$, triplet,
 JP-C = 133 Hz ; $C5 = 30,0 \text{ ppm}$; $C4 = 52,175 \text{ ppm}$, doublet,
 $J = 3 \text{ Hz}$; $C2 = 62,0 \text{ ppm}$; $C2' = 61,9 \text{ ppm}$; $C3 = 175 \text{ ppm}$.

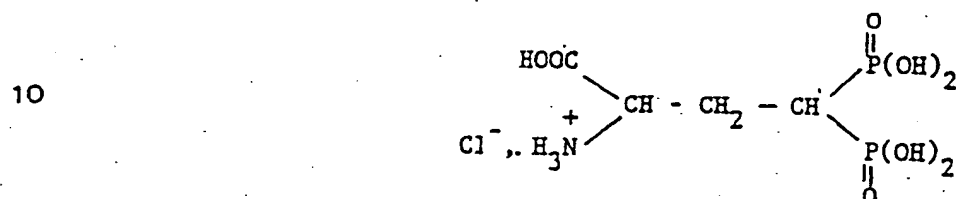
b.3. Passage aux formes acide et sel

- passage à la forme acide

35 Dans un tricol de 100 ml, on place 10 g d'amino-2 bis diéthyl phosphono-4,4 butyrate d'éthyle et 40 ml d'acide chlorhydrique concentré (12,4 N). Le mélange est porté au reflux de l'acide chlorhydrique pendant une nuit.

Après évaporation de l'acide chlorhydrique en excès, le résidu est repris à l'eau puis évaporé à nouveau. Le solide récupéré est repris dans un mélange eau + charbon actif.

Après filtration à chaud puis évaporation du solvant au rotavapor, on récupère après passage à l'étuve un produit cristallisé blanc qui correspond au chlorhydrate du composé recherché avec un rendement de 80 %.



15 - libération du chlorhydrate par l'oxyde de propylène.

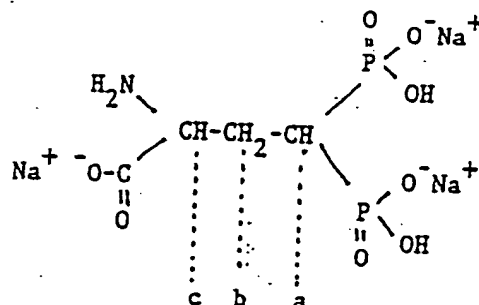
On place 2,20 g de chlorhydrate précédent dans un tricol de 100 ml en solution dans 40 ml d'éthanol plus 1 ml d'HCl concentré pour obtenir la dissolution totale du produit. Le mélange est mis sous agitation magnétique et la température est abaissée à 10°C à l'aide d'un bain de glace. Par une ampoule isobare, on additionne alors 15 ml d'oxyde de propylène. Après quelques minutes d'agitation, on évapore le solvant pour récupérer un solide blanc que l'on recristallise dans un mélange eau-méthanol (1-3). Le produit, alors caractérisé par RMN du phosphore : $\delta P = 21,3$ ppm.

- passage au trisel de sodium

30 L'acide libéré de son chlorhydrate est repris dans de l'eau distillée et solubilisé à chaud. Un volume de solution aqueuse de NaOH 0,1 N correspondant à 3 équivalents est additionné. On passe ainsi d'un pH de 2 à un pH de 8,5.

Après évaporation de l'eau au rotavapor et passage du produit à l'étuve, on récupère un solide blanc avec un rendement de 90 %.

- 14 -

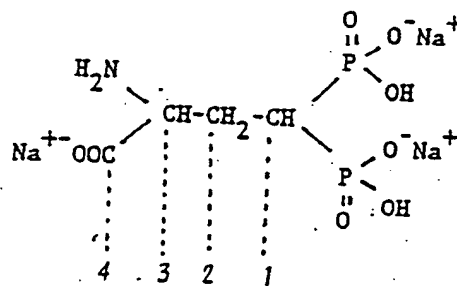


Spectre RMN :

10 Phosphore (dans D₂O) : δ 21,02 ppm, douplet, $J_{P-P} = 10$ Hz.

Proton (dans D₂O) : δ_{Hb+Hc} : entre 2,8 et 2,4 ppm, multiplet,
; $H_a = 4$ ppm, dd.

¹³C (dans D₂O)



$\delta_{C3} = 30,4$ ppm ; $C1 = 40,7$ ppm, t, $J_{C1-P} = 110$ Hz ;

$C2 = 58,1$ ppm, t, $J_{C2-P} = 6$ Hz ; $C4 = 178,3$ ppm.

25 c) Condensation de l'amino-2 bis diéthylphosphono-4,4 butyrate d'éthyle sur le chlorure de l'acide p-(N-(méthylamino)) benzoïque N-protégé

30

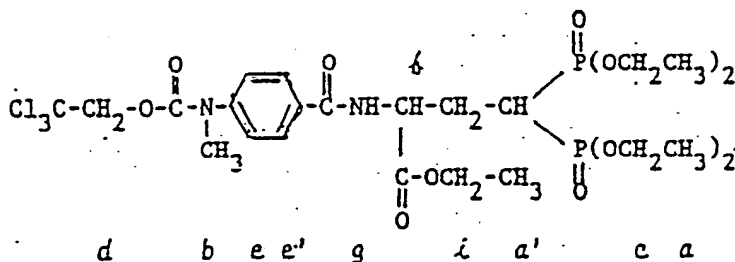
C.1. condensation suivant Schotten-Baumann

Dans un tricol de 1000 ml muni d'une agitation mécanique, d'un thermomètre à alcool, d'une ampoule isobare, on dispose sous atmosphère d'azote, 200 ml d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. On introduit ensuite l'ester aminophosphonique en solution dans l'acétate d'éthyle et on refroidit l'ensemble vers 0°C.

35

On additionne alors par l'ampoule isobare, le chlorure de l'acide p-(Nméthylamino)benzoïque N-protégé en solution dans un mélange acétate d'éthyle-éther en maintenant une agitation vigoureuse. Cette agitation est poursuivie pendant 4 heures à température ambiante. Par décantation, on isole la phase organique qui est successivement lavée à l'eau, à l'acide chlorhydrique 1N, puis de nouveau à l'eau. Après séchage sur sulfate de magnésium, les solvants sont éliminés au rotavapor et l'ester N-(p-(N-(trichloroéthoxycarbonyl)méthylamino) benzoyl) aminophosphonique isolé. La purification est obtenue par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Solvants d'élution : Acétate d'éthyle pur puis acétate d'éthyle-éthanol (95-5).



rendement = 60 % après chromatographie

Spectre RMN (CDCl_3)

Phosphore : un pic à $\delta = 23,4$ ppm

Proton : $\delta \text{Ha} + \text{a}' =$ entre 1 et 1,5 ppm, t ; $\text{Hb} = 3,4$ ppm, s,

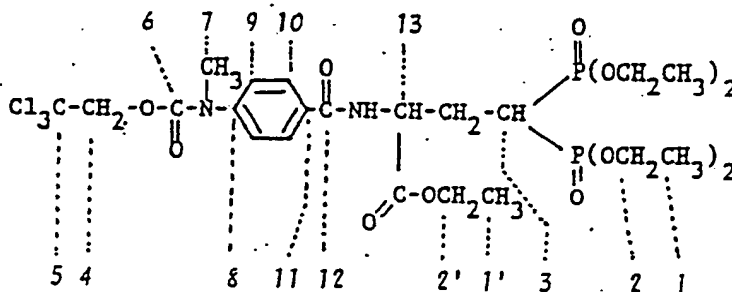
$\text{Hc} + \text{c}' =$ entre 4 et 4,5 ppm, multiplet ; $\text{Hd} = 4,75$ ppm,

s ; $\text{He} + \text{e}' = 7,4$ ppm, doublet, 8,2 ppm, doublet, spec-

tre AB ; $\text{Hf} = 7,6$ ppm, s ; $\text{Hg} = 8,6$ ppm, doublet

large.

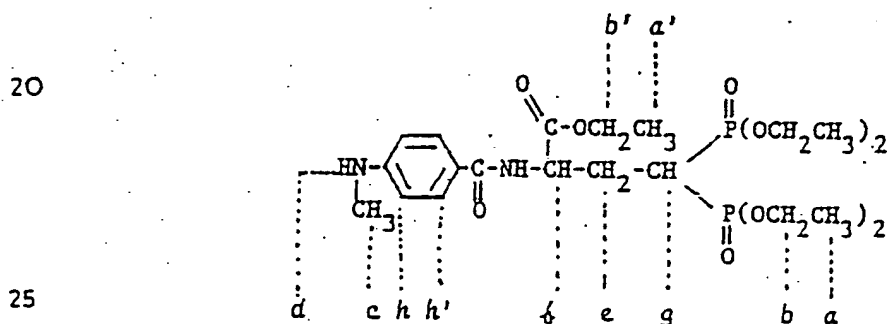
Carbone 13



δ C1+C1' = 13,5-15,8 ppm ; C3 = 32,2 ppm, t, JP-C3=130Hz ; C7 = 37,0 ppm ; C2+C2' = 59,6-62,5 ppm ; C13 = 60,7-62,5 ppm, d ; C5 = 94,7 ppm ; C11 = 126,5 ppm ; C10 = 127,6 ppm ; C9 = 130,5 ppm ; C8 = 152,6 ppm ; C10 ; 165,9 ppm ; C12 = 170,5 ppm.

5 c.2. déprotection de la fonction amine

Dans un tricol de 100 ml, on met en présence 6 g de poudre de zinc en solution dans du tétrahydrofurane et une solution aqueuse de phosphate potassique monobasique de pH voisin de 4. Quand la température du mélange est inférieure à 5°C, on additionne goutte à goutte par une ampoule isobare, 7,3 mmole de produit à déprotéger. La température est contrôlée au bain de glace pendant l'addition. L'agitation est maintenue pendant quelques heures à température ambiante. Après filtration et évaporation du tétrahydrofurane, le résidu est repris dans un mélange eau + chloroforme. Après décantation et extraction au chloroforme, la phase organique récupérée est séchée sur sulfate de magnésium puis le solvant évaporé. On récupère ainsi quantitativement le produit déprotégé.



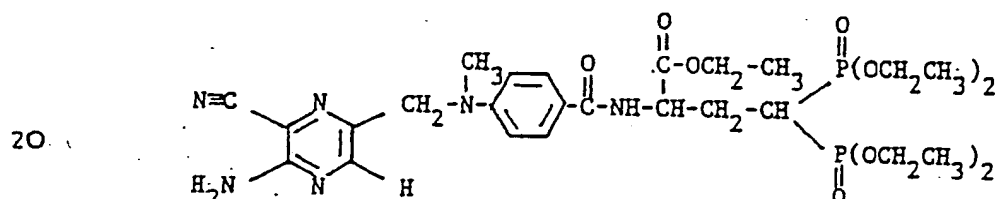
Spectre :RMN (CDCl_3)

30 Phosphore : Spectre de type AB centré sur $\delta = 23,67$ ppm
1=23,85 ; 2=23,79 ; 3=23,55 ; 4 = 23,49 ; JPP=2,44Hz.

Proton: $\delta_{\text{Ha}+\text{a}'} = 1,25$, t ; $\text{Hf}+\text{Hg} =$ entre 1,9 et 2,4 ppm, massif ;
He = 2,5 ppm, t, mal résolu ; $\text{Hc} = 2,85$ ppm, s. Le dé-
placement chimique du N-CH_3 sort à champ plus fort par
rapport au composé N-protégé ($\delta = 3,4$ ppm) ; $\text{Hb}+\text{Hb}'$:
entre 3,3 et 4,4 ppm, multiplet ; $\text{Hh}+\text{h}'$: spectre de type
AB centré sur 7,15 ppm.

d) Synthèse de la pyrazine ester diphosphonique

Dans un tricol de 100 ml, on place $2,5 \cdot 10^{-3}$ mole de diphosphonate en solution dans 20 ml d'acétonitrile et $7,1 \cdot 10^{-3}$ mole de carbonate de potassium. $2,5 \cdot 10^{-3}$ mole d'amino-2 cyano-3 bromométhyl-5 pyrazine en solution dans 40 ml d'acétonitrile sont additionnées au mélange précédent à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant 48 heures. L'avancement de la réaction est suivi en chromatographie sur couche mince de gel de silice (solvant d'élution = acétate d'éthyle). L'acétonitrile est évaporé au rotavapor, le produit récupéré est alors remis en solution dans un mélange eau-chloroforme. Après décantation, on extrait au chloroforme, sèche la phase organique sur sulfate de sodium, filtre sur büchner et enfin évapore le solvant. Le composé récupéré est alors purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (solvant d'élution = acétate d'éthyle - éthanol 95-5). Rf = 0,18.

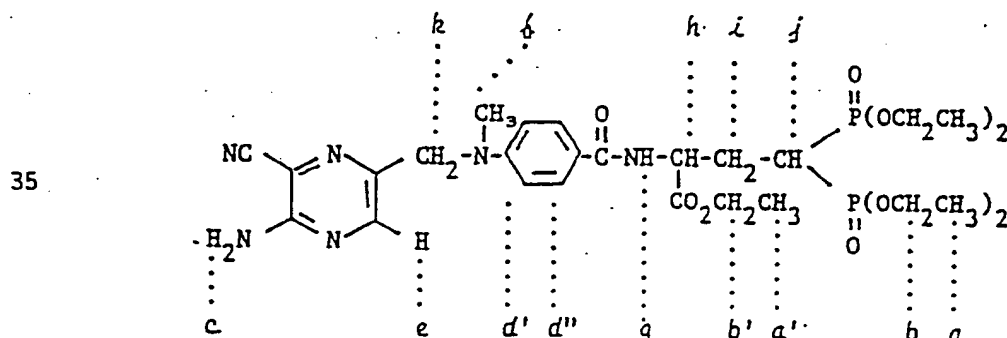
25. Spectre RMN (CDCl₃)

Phosphore : Spectre de type AB centré sur δP : 23,63 ppm

1 = 23,88 ppm ; 2 = 23,79 ppm ; 3 = 23,46 ppm ; 4 = 23,37 ppm.

JP-P : 3,66 Hz

30. Proton :



- 18 -

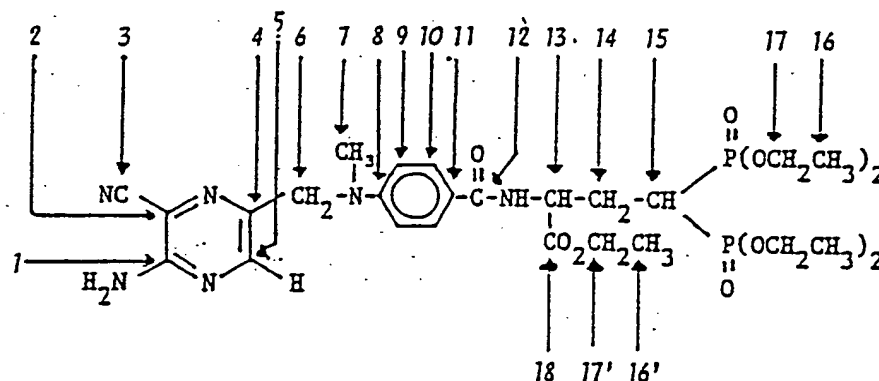
$\delta_{\text{Ha+a'}} = 1,3 \text{ ppm}$, multiplet ; $\text{Hi+j} = \text{entre } 2,1 \text{ et } 3,1 \text{ ppm}$, multiplet, (3H) ; $\text{Hf} = 3,1 \text{ ppm}$, s, (3H) ; $\text{Hb+b'} = \text{entre } 4 \text{ et } 4,4 \text{ ppm}$, multiplet ; $\text{Hk} = 4,6 \text{ ppm}$, s ; $\text{Hh} = 4,8 \text{ ppm}$, massif ; $\text{Hc} = 5,5 \text{ ppm}$, s ; $\text{Hd+d''} = 6,7 \text{ ppm}$, d, $7,8 \text{ ppm}$, d, type AA' BB' ; $\text{Hg} = 7,3 \text{ ppm}$, s ; $\text{He} = 8,1 \text{ ppm}$, s.

5

 ^{13}C

10

15



20

25

30

35

^{13}C	$\delta \text{ (ppm)}$	^{13}C	$\delta \text{ (ppm)}$
$\text{C}_{16'}$	13,8	C_2	111,8
C_{16}	$\begin{cases} 15,98 \\ 16,23 \end{cases}$; <u>d</u>	C_3	115,06
C_{15}	32,6 ; <u>t</u> ; $^1\text{J}_{\text{P-C}} = 135,27\text{Hz}$	C_{11}	121,09
C_7	38,9	C_{10}	128,8
C_{13}	52,6	C_4	143
C_6	54,9	C_5	144,8
$\text{C}_{17'}$	61,1	C_8	150,85
C_{17}	$\begin{cases} 62,9 \\ 62,7 \end{cases}$; <u>d</u>	C_1	155,47
C_9	111,07	C_{12}	167,07
		C_{18}	171,28

Spectre infrarouge (γ en cm^{-1}) : $\text{P}=\text{O}$ (1030-1070) TF ; $\text{P}=\text{O}$ (1250-1210) TF ; $\text{C}=\text{NH}$ (1650) ; $\text{C}=\text{OEt}$ (1750) TF ; $\text{C}\equiv\text{N}$ (2250) F ; NH_2 (3350).

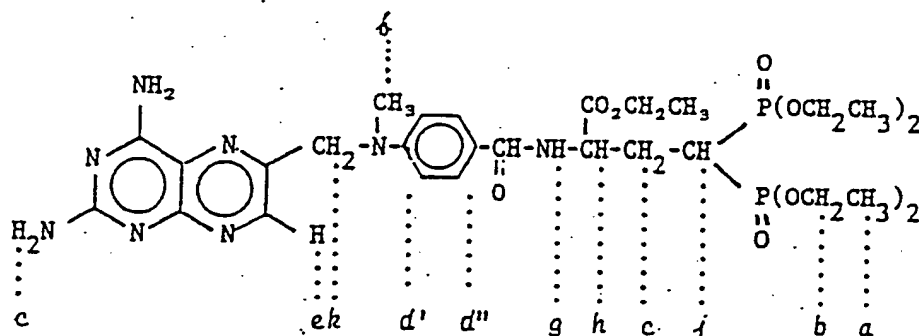
e) Formation du noyau ptéridique par condensation de la guanidine :
Accès au composé **2a** où $\text{R}^3 = \text{C}_2\text{H}_5$ et $\text{R}^1 = \text{CH}_3$

Dans un tricol de 500 ml placé sous atmosphère d'azote et sous agitation magnétique, on place $12,5 \cdot 10^{-3}$ mole de sodium métallique qu'on laisse se consumer dans 300 ml d'éthanol. A ce mélange on additionne $12,45 \cdot 10^{-3}$ mole de chlorhydrate de guanidine préalablement séché à l'étuve. On laisse décanter le NaCl au fond du tricol et on récupère le surnageant auquel on ajoute $4 \cdot 10^{-3}$ mole de pyrazine ester diphosphonique. L'agitation est alors maintenue plusieurs jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un suivi par chromatographie sur couches minces de gel de silice peut être réalisé. Après évaporation de l'éthanol au rotavapor, on récupère un solide jaune orangé.

Spectre RMN

Phosphore (DMSO) : $\delta \text{P} = 29,21$ ppm

Proton (DMSO)

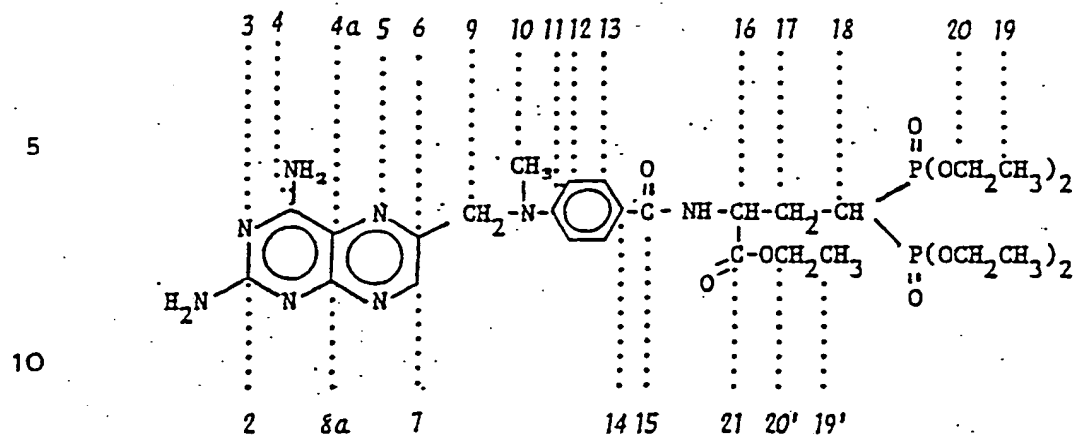


δHa : entre 1,15 et 1,30 ppm, multiplet ; $\text{Hf} = 3,18$ ppm, s ;
 Hb : entre 3,7 et 4,3 ppm, multiplet ; $\text{Hh} = 4,6$ ppm, massif ;
 $\text{Hd'd''} = 6,84$ ppm, d, $7,70$ ppm, d, type AA'BB' ; $\text{Hg} = 7,25$ ppm, massif ; $\text{He} = 8,31$ ppm, s.

DMSO: dimethylsulfoxyde deutérié

- 20 -

Carbone 13 (DMSO)



^{13}C	δ (ppm)	^{13}C	δ (ppm)
C_{19}	$\begin{cases} 16,93 \\ 17,2 \end{cases}$, d, $J_{\text{P-C}} = 6,1\text{Hz}$	C_6	145,9
C_{10}	39,6	C_7	146,7
$\text{C}_{20-20'}$	62,9	C_{8a}	154,5
C_{4a}	112,3	C_{15}	167,1
C_{14}	114,3 ; 122,2 ;	C_{21}	174,0
C_{13}	124,0 ; 130		
C_{12}			

30

f) Passage au composé 1a où $\text{R}^1 = \text{CH}_3$

f.1. saponification de l'ester carboxylique

Le produit récupéré de l'étape précédente est repris dans l'éthanol et placé dans un tricol de 500 ml sous atmosphère inerte d'azote et sous agitation magnétique.

35

On ajoute alors une quantité stoechiométrique d'une solution alcoolique de soude 1N. Le mélange est légèrement chauffé à 35°C pendant une heure et demie, puis l'éthanol est évaporé. Le produit solide récupéré est repris dans de l'eau distillée puis acidifié jusqu'à pH = 3 par une solution d'HCl 0,2 N. Après évaporation de l'eau au rotavapor, on sèche le produit à l'étuve à vide.

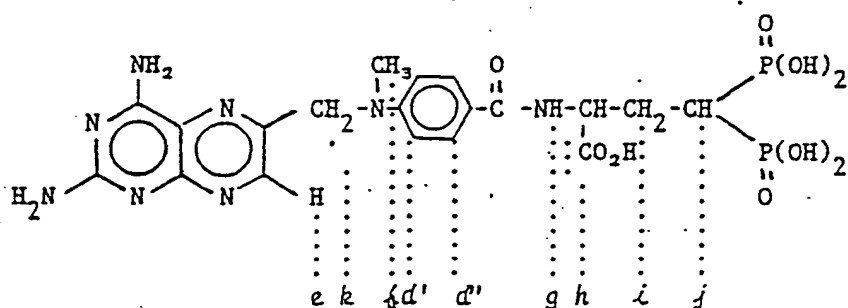
f.2. hydrolyse des esters phosphoniques

Les fonctions esters phosphoniques sont silylées par le bromure de triméthylsilyle dans l'acétonitrile à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant 48 heures à l'abri de la lumière. Les esters silylés sont alors coupés par méthanolyse, le solvant est éliminé au rotavapor. Le produit solide récupéré est séché à l'étuve sur P_2O_5 .

Spectre RMN

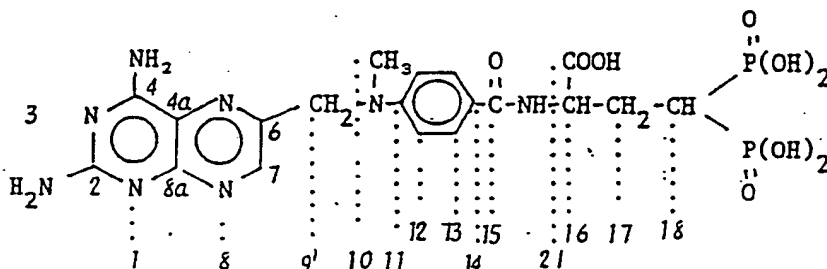
Phosphore (DMSO + ATFA) : $\delta.P = 25,61 - 25,34$ ppm, d, JP-P = 11 Hz.

Proton (DMSO + ATFA)



δ Hi+Hj : entre 1,9 et 2,8 ppm, multiplet ; Hf = 3,1 ppm, s ;
Hk+Hh = entre 4,5 et 5,1 ppm, massif ; Hd''d' = 7,83, d, 6,86, d
type AA'BB' ; Hg = 7,3 ppm, massif ; He = 8,74 ppm, s.

^{13}C (ATFA)



ATFA: acide trifluoroacétique deutérié

^{13}C	δ (ppm)	^{13}C	δ (ppm)
C_{16}	29,7	C_{11}	151,2
C_{10}	35,3	C_{15}	170,1
C_9	52,9	C_{21}	176,1
$\text{C}_6\text{-C}_7$	144,4-143,7-143,2		

10 On note la disparition des pics correspondants aux déplacements des carbones des fonctions esters.

f.3. Passage au sel de sodium du composé 1a

15 On dissout partiellement le produit récupéré plus haut dans 20 ml de méthanol distillé puis on additionne 60 ml d'une solution aqueuse de soude 1N. Après une nuit d'agitation à l'abri de la lumière on récupère après évaporation des solvants, un produit solide
 20 liquide à haute performance sur une matière absorbante à phase inversée (JOBIN-YVON - Phase nucléosil C_{18} , $\lambda = 290$ nm).

Spectre RMN.

25 Phosphore (dans D_2O) : un pic dédoublé $\delta 1 = 22,0$ ppm ;
 $\delta 2 = 22,37$ ppm JP-P = 14,6 Hz.

30

EXEMPLE 2

SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **1b** ou $R^1 = H$

5 a) Synthèse de l'acide amino-4 désoxy-4 déaza-4 ptéroïque

b) formation du noyau ptéridine : obtention du composé **2b**
où $R^1 = H$, $R^2 = C_2H_5$ et $R^3 = C_2H_5$

10 b.1. synthèse de l'amino-2 bis diéthylphosphono-4,4 butyrate
d'éthyle.

reprise de la méthode utilisée en c) de l'exemple 1.

15 b.2. synthèse du composé **2b**. Couplage peptidique par la
méthode "à l'anhydride mixte".

Dans un tricol de 250 ml muni d'une agitation magnétique, on
place 1,24 g ($4 \cdot 10^{-3}$ mole) d'acide déaza ptéroïque, 1,75 ml de trié-
20 thylamine fraîchement distillée et 100 ml de DMF sec.

Sous atmosphère inerte d'azote, on additionne dans un premier
temps, 0,52 ml ($4 \cdot 10^{-3}$ mole) d'isobutylchloroformate. Il se forme
alors l'anhydride mixte.

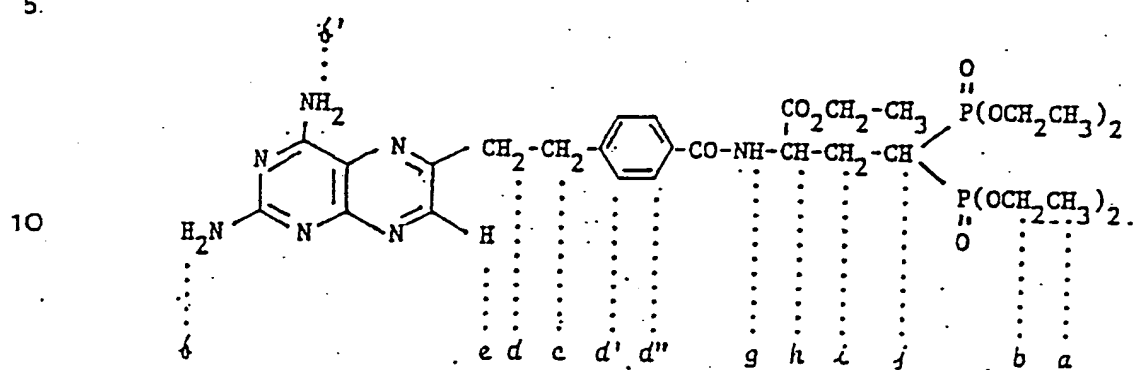
25 Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, on ajoute
1,61 g d'amino ester ($8 \cdot 10^{-3}$ mole) et une minute plus tard à nouveau
0,26 ml ($2 \cdot 10^{-3}$ mole) d'isobutylchloroformate.

30 Au bout de 15 minutes 0,80 g d'ester sont additionnés, suivis
de 0,13 ml d'isobutylchloroformate.

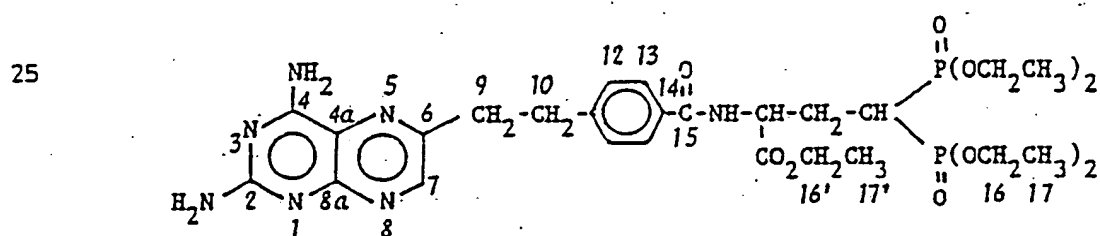
Après un délai de 15 minutes, on ajoute à nouveau 0,40 g
d'ester puis une minute plus tard 0,13 ml d'isobutylchloroformate.

0,40 g d'ester sont finalement additionnés au bout d'un quart d'heure.

- Spectre RMN

Proton (DMSO d^6)

δ Ha = 1,18, t ; Hh+i+d+c : entre 2,87 et 3,13 ppm, multiplet ;
Hb : entre 3,8 et 4,25 ppm, multiplet ; Hj = 6,84 ppm, mas-
sif ; Hd'd'' = spectre de type AB, 7,33 ppm, d, 7,81 ppm, d ;
Hg = 7,7 ppm, s large, He = 8,57 ppm, s.

$$^{31}\text{P} \text{ (DMSO } d^6) : \quad \delta = 27,9 \text{ ppm.}$$
 ^{13}C (DMSO d^6)

^{13}C	δ (ppm)	^{13}C	δ (ppm)
17-17'	15,2 17,0	14	122,4
9	46,2	$\begin{smallmatrix} 13 \\ 12 \end{smallmatrix}$	128,4-129,5
16-16'	61,4 63,3	6-7	146

c) passage au composé 1b

c.1. libération des esters phosphoniques

2,4 g d'ester sont placés en solution dans 20 ml de CH_2Cl_2
5 en présence de 3,64 ml de bromure de triméthylsilyle (8 équivalents)
L'agitation est maintenue à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 heures.

Après évaporation du chlorure de méthylène, on récupère un
10 solide jaune clair que l'on traite par 20 ml de méthanol. Puis on évapore le méthanol pour obtenir un produit solide orangé.

c.2. libération de l'ester carboxylique

15 Le produit intermédiaire récupéré précédemment est traité par une solution de soude dans un mélange eau méthanol (25-75) pendant plusieurs jours. Après évaporation des solvants et reprise en milieu aqueux, on contrôle le pH qui ne doit pas être supérieur à 8. L'eau
20 est alors évaporée et on récupère 0,92 g d'un produit solide jaune-pâle. La purification finale du composé 1b est effectuée par chromatographie liquide à haute performance sur une matière absorbante en phase inversée.

spectre RMN
25 phosphore..(D_2O) $\delta \text{P} = 23,5 \text{ ppm}$

Expérimentations biologiques

Dix lots de souris C3H femelles greffés au jour J_0 par l'ostéosarcome ostéogénique de la souris C3H, en sous-cutané sont traités (traitement unique) au jour J_1 en administrant du méthotrexate ou à des fins comparatives du dérivé gem diphosphonique du méthotrexate.

L'activité anticancéreuse du dérivé gem-diphosphonique du méthotrexate a été évaluée par rapport au méthotrexate sur la base de l'évolution de la croissance tumorale par mesure du rapport $T/C = \frac{\text{volume tumoral moyen traité}}{\text{volume tumoral moyen contrôle}} \times 100$.

La toxicité des diverses doses a été évaluée d'après l'étendue de la perte de poids Δp entre le premier et le cinquième jour (de J_1 à J_5).

Les résultats représentatifs obtenus sont les suivants :

20	traitement (à J_1)	toxicité Δp à J_5	activité T/C (%)		
			à J_{21}	à J_{30}	à J_{37}
	méthotrexate 7,5 mg/kg VO	- 2,4	110	115	122
25	méthotrexate 15 Mg/Kg VO	- 3,1	69	83	99
	méthotrexate 15 mg/kg SC	- 1,6	123	123	138
30	1a 3,75 mg/kg VO	- 0,7	297	131	138
	1a 7,5 mg/kg VO	- 0,9	169	106	114
	1a 15 mg/kg VO	- 0,1	73	76	101
35	1a 30 mg/kg VO	- 0,2	100	64	66

VO : voie orale - SC : sous cutanée - IP : intrapéritonéale

- 27 -

Il ressort des résultats donnés ci-dessus qu'aucune toxicité particulière n'existe chez les animaux traités par le dérivé analogue gem diphosphonique du méthotrexate. D'autre part il existe un ralentissement tardif et prolongé de la croissance tumorale (J_{30} - J_{37}) pour le dérivé diphosphonique (30 mg/kg VO).

5

Il apparait que l'activité de ces dérivés est fonction de la dose administrée.

D'autres tests biologiques similaires montrent que

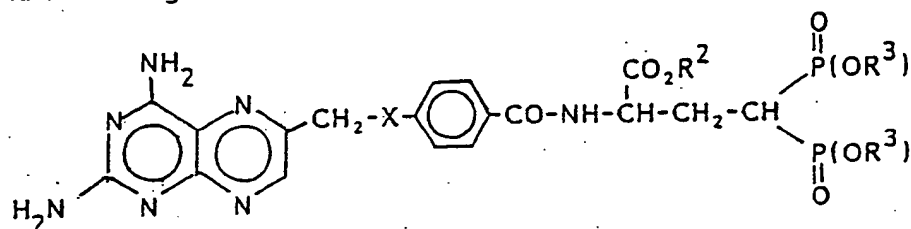
10 ces composés analogues gem diphosphoniques d'améthoptérine ont une activité 30 mg/kg VO (en traitement unique) comparable à celle du méthotrexate 15 mg/kg VO et 50 mg/kg IP (traitements uniques).

15 Attendu que le méthotrexate est considéré comme efficace, on peut s'attendre à ce que ces dérivés analogues gem diphosphoniques soient au moins aussi efficaces que le méthotrexate dans des conditions similaires.

20 L'activité anticancéreuse des dérivés analogues gem diphosphoniques du méthotrexate ressort de ces résultats d'essais.

REVENDEICATIONS

1) Composés gem-diphosphoniques analogues d'améthoptérine (Methotrexate) et de déaza N-10 améthoptérine répondant à la formule générale :



Où X = $\begin{array}{c} R^1 \\ | \\ -N- \\ | \\ R^1 \end{array}$. $\begin{array}{c} R^1 \\ | \\ -CH- \\ | \\ R^1 \end{array}$

R^2 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

avec R^1 = H, alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

R^2 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6).

ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

2) Composés selon la revendication 1 dans lesquels X signifie $\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ -N- \end{array}$ ou $-CH_2-$ ainsi que leur sels pharmaceutiquement acceptables.

3) Procédé pour l'obtention des composés selon l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel on effectue les étapes suivantes :

a) addition nucléophile de carbanions de N-benzylidène glycinate d'alkyle sur les vinylidène diphosphonates de dialkyle-1,1 6 pour obtenir les amino-2 bis dialkyle phosphono-4,4 butyrates d'alkyle de formule générale 5 après une hydrolyse en milieu HCl 0,5 N.

b) Condensation des composés de type 5 sur les chlorures d'acides para-N(alkylamino) benzoïques protégés par le trichloro-1,1,1 éthoxycarbonyle pour obtenir les composés de type 4a après déprotection de la fonction amine.

- 29 -

c) Condensation des composés de type 4a sur l' amino-2 bromométhyl-5 cyano-3 pyrazine pour obtenir les pyrazines diphosphoniques 3a.

d) Condensation des pyrazines diphosphoniques 3a avec la guanidine pour obtenir les dérivés 2a.

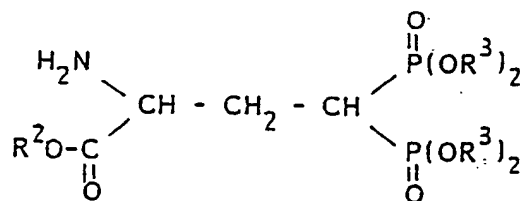
e) Saponification de ces dérivés suivie de l'action du bromure de triméthyl silyle et d'une méthanolyse pour obtenir les formes acides 1a.

f) Formation de tout sel correspondant pharmaceutiquement acceptable.

g) Pour la synthèse des dérivés 1b condensation de l'acide amino-4 desoxy-4 déaza-10 ptéroïque par la méthode de l'anhydride mixte.

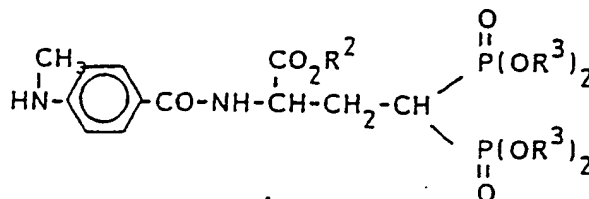
4) A titre de composés intermédiaires utilisés dans le procédé ci-dessus :

a) les dérivés gem-diphosphoniques nouveaux de formule générale 5 :



R^2 =alkyles inférieurs (C_1 à C_6) ; R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6) ainsi que l'acide 5a et les sels pharmaceutiquement acceptables (p.e 5b pour le sel de sodium).

b)

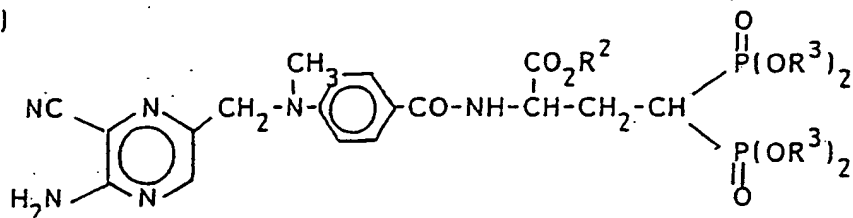


R^2 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)
 R^3 = alkyles inférieurs (C_1 à C_6)

- 30 -

5

c)

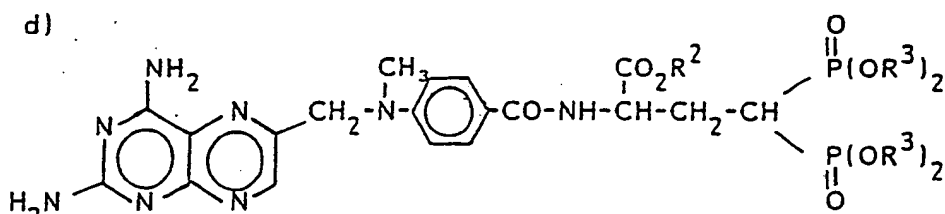


10

3a $R^2 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$ $R^3 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$

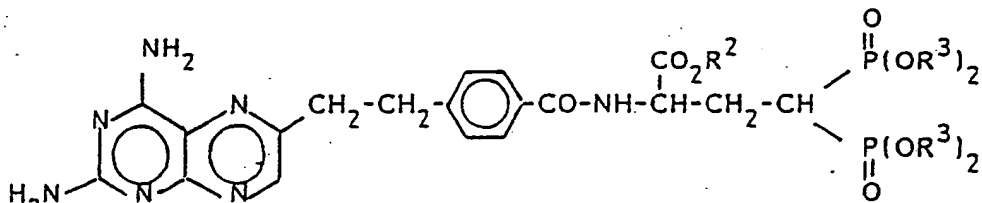
15

d)

2a $R^2 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$ $R^3 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$

20

e)



25

2b $R^2 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$ $R^3 = \text{alkyles inférieurs (C}_1 \text{ à C}_6\text{)}$

30

5) Composition pharmaceutique destinée plus particulièrement au traitement des tumeurs osseuses mais également en rhumatologie au traitement par exemples de rhumatismes psoriasiques rebelles, de polymyosites, de la maladie de Reiter et de polyarthrites rhumatoïdes.

6) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient comme ingrédient actif, au moins un produit selon la revendication 1 ou un de ses sels, en association avec un adjuvant ou un enrobage pharmaceutiquement acceptable.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00088

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁴ C07F 9/65; A61K 31/675; C07F 9/38; C07F 9/40		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	C07F 9/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁸		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 10ième édition, 1983, Merck & Co., Inc. (Rahway, New Jersey, US) pages 859-860, article Nr. 5861 see the abstract -----	1,5,6
A	EP, A, 0186405 (THE PROCTER & GAMBLE CO.) 2 July 1986 see claims -----	1,5,6
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
24 May 1988 (24.05.88)		08 July 1988 (08.07.88)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

FR 8800088

This annex lists the patent-family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 23/06/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0186405	02-07-86	AU-A- 5153485 JP-A- 61210033	26-06-86 18-09-86

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00088

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB⁴: C 07 F 9/65; A 61 K 31/675; C 07 F 9/38; C 07 F 9/40		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 07 F 9/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 10ième édition, 1983, Merck & Co., Inc. (Rahway, New Jersey, US), pages 859-860, article no. 5861, voir le résumé	1,5,6
A	EP, A, 0186405 (THE PROCTER & GAMBLE CO.) 2 juillet 1986, voir revendications	1,5,6
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 24 mai 1988		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 0 8. 07. 88
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé P.E.G. VAN DER PUTTEN

FR 8800088 .
SA 21118

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.

Lesdits members sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/06/88

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0186405	02-07-86	AU-A- 5153485 JP-A- 61210033	26-06-86 18-09-86
